

09/719017  
528 R PCT/PTO 07 DEC 2000

INDUSTRIAL METHOD  
FOR PRODUCING  
HETEROLOGOUS PROTEINS  
IN E.COLI  
AND STRAINS USEFUL  
FOR SAID METHOD

Jérôme Pierrard  
Carole Guitton  
-and-  
Olivier Favre-Bulle

INTERNATIONAL  
FRENCH APPLICATION  
OF  
PCT/FR99/01343 . . . . - IFD - 06/08/1999  
-WITH-  
Four (4) Sheets of Drawings  
-and-  
Four (4) Sequence Listing Sheets

PH-98/032 . . . . (5500\*54)

"Express Mail" mailing label  
number EE617838829

Date of Deposit

December 07, 2000

I hereby certify that this paper or fee is  
being deposited with the United States Postal  
Service "Express Mail Post Office to  
Addressee" service under 37CFR 1.10 on the  
date indicated above and is addressed to the  
Assistant Commissioner for Patents,  
Washington, D.C. 20231

- Jean Marshall -

(Typed or printed name of person mailing  
paper or fee)

Jean Marshall  
(Signature of person mailing paper or fee)



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :  C12N 15/55, 9/78, 9/80, 15/71, 1/21, C12P 21/02 // (C12N 1/21, C12R 1:19)		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 99/64607</b>  (43) Date de publication internationale: 16 décembre 1999 (16.12.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01343  (22) Date de dépôt international: 8 juin 1999 (08.06.99)		(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(30) Données relatives à la priorité: 98/07474 10 juin 1998 (10.06.98) FR		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>	
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE [FR/FR]; 42, avenue Aristide Briand, F-92160 Antony (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): PIERRARD, Jérôme [FR/FR]; 3, rue Hector Berlioz, F-69009 Lyon (FR). GUITTON, Carole [FR/FR]; 23, rue du Petit Montessuy, F-69009 Lyon (FR). FAVRE-BULLE, Olivier [FR/FR]; 113, rue Baraban, F-69003 Lyon (FR).			
(74) Mandataire: TETAZ, Franck; Rhône-Poulenc Agro, 14/20, rue Pierre Baizet, F-69009 Lyon (FR).			
<p>(54) Title: INDUSTRIAL METHOD FOR PRODUCING HETEROLOGOUS PROTEINS IN <i>E.COLI</i> AND STRAINS USEFUL FOR SAID METHOD</p> <p>(54) Titre: PROCEDE INDUSTRIEL DE PRODUCTION DE PROTEINES HETEROLOGUES CHEZ <i>E. COLI</i> ET SOUCHES UTILES POUR LE PROCEDE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns an industrial method for preparing heterologous proteins in <i>E.coli</i>, which consists in seeding and cultivating in an appropriate culture medium <i>E.coli</i> bacteria modified with an appropriate system for expressing heterologous proteins, characterised in that the <i>E.coli</i> strain is an <i>E.coli</i> W strain.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne un procédé industriel de préparation de protéines hétérologues dans <i>E.coli</i>, dans lequel on ensemence et on cultive dans un milieu de culture approprié des bactéries <i>E.coli</i> modifiées avec un système d'expression de protéines hétérologues approprié, caractérisé en ce que la souche de <i>E.coli</i> est une souche <i>E.coli</i> W.</p>			

PROCEDE INDUSTRIEL DE PRODUCTION DE PROTEINES HETEROLOGUES  
CHEZ *E. COLI* ET SOUCHES UTILES POUR LE PROCEDE

5 La présente invention concerne un nouveau procédé industriel de production de protéines hétérologues chez *E. coli*. Si pour certaines protéines hétérologues à très haute valeur ajoutée le prix de revient de leur procédé de préparation reste un facteur négligeable par rapport à la finalité de la protéine hétérologue (dans le domaine pharmaceutique notamment), le développement de la production industrielle de protéines hétérologues de moindre valeur ajoutée dans *E. coli* passe par la prise en compte de facteurs de production tels que la nécessité d'avoir une biomasse élevée et une très forte teneur en protéines hétérologues produites pour un coût le plus bas possible. lequel coût doit tenir compte de la nature du milieu, du rendement énergétique et en réactifs, et des conditions opératoires. Pour des productions industrielles avec des volumes réactionnels pouvant atteindre plusieurs dizaines de m<sup>3</sup>, on cherchera les milieux et les conditions opératoires les plus simples possibles. La présente invention consiste en la sélection d'une souche de *E. coli* appropriée pour répondre aux conditions ci-dessus, essentielles à la production industrielle économiquement satisfaisante de protéines hétérologues, indépendamment de la valeur de la protéine produite.

20

Les souches d'*E. coli* les plus couramment utilisées pour les travaux de biologie moléculaire dérivent de la souche K12 (Swartz, 1996, In *Escherichia coli and Salmonella*, Cellular and Molecular Biology, 2<sup>nd</sup> edition, ASM Press Washington, pp1693-1711). Des dérivés d'*E. coli* B, tels que BL21, sont également utilisés pour la production de protéines à cause de leur propriétés physiologiques. Un tableau des souches les plus couramment utilisées pour la production de protéines recombinantes est donné par Wingfield, 1997 (Current Protocols in Protein Science, Coligan *et al.* Ed. John Wiley & Sons, Inc. 5.0.1-5.0.3).

25

De nombreux systèmes d'expression de protéines chez des hôtes bactériens ont été décrits (Makrides, 1996, Microbiol. Rev. 60:512-538; Current Opinions in Biotechnology, 1996, 7). Un système d'expression est constitué d'un promoteur, de son régulateur, d'un site de fixation du ribosome suivi d'un site de restriction permettant l'insertion du gène d'intérêt, d'une structure pouvant servir de terminateur de

30

transcription, éventuellement de gènes dont la coexpression augmentent la qualité de la protéine d'intérêt surexprimée et d'un ou plusieurs vecteurs permettant d'introduire dans l'hôte ces combinaisons.

Le promoteur doit présenter au moins trois caractéristiques pour être utilisé dans 5 un procédé de production de protéines (Makrides, 1996, précité) :

- il doit être fort et conduire à l'accumulation de la protéine d'intérêt qui peut représenter 10 à 50 % des protéines totales de la cellule hôte;
- il doit pouvoir être régulé de façon pouvoir autant que possible découpler la phase de production de biomasse de la phase de production de la protéine;
- 10 - il doit être inductible (passage d'un niveau de faible activité transcriptionnelle à un niveau maximal d'activité transcriptionnelle) avec des conditions de procédé simples et bon marché.

De nombreux promoteurs ont été décrits pour l'expression chez *E. coli* (Makrides, 1996, précité; Weickert *et al.*, 1996, Current Opinions in Biotechnology 7 : 494-499). Parmi 15 les promoteurs homologues utilisés pour la production de protéines chez *E. coli*, on peut citer les promoteurs *lac*, *trp*, *lpp*, *phoA*, *recA*, *araBAD*, *proU*, *cst-1*, *tetA*, *cadA*, *nar*, *tac*, *trc*, *lpp-lac*, *Psyn*, *cspA*. Parmi les promoteurs hétérologues utilisés pour la production de protéines chez *E. coli*, on peut citer les promoteurs *PL*, *PL-9G-50*, *PR-PL*, *T7*,  $\lambda$ *PL-PT7*, *T3-lac*, *T5-lac*, *T4 gene 32*, *nprM-lac*, *VHb*, *Proteine A*. Un certain nombre 20 d'inconvénients sont liés à ces promoteurs. On peut citer pour certains d'entre-eux l'utilisation de l'IPTG comme molécule inductrice, dont le prix peut représenter plus de 14 % du coût du milieu. D'autres utilisent une régulation par la température, difficile à mettre en œuvre à l'échelle d'un fermenteur industriel de 100 m<sup>3</sup>.

Les vecteurs les plus couramment utilisés pour l'expression de protéines chez *E. coli* dérivent du plasmide pBR322 (Swartz, 1996, précité; Makrides, 1996, précité). Ils 25 sont présents dans les cellules à un certain nombre de copies, déterminé par l'interaction de deux ARN codés par le plasmide, RNAI et RNAII (Polisky, 1988, Cell 55 : 929-932). L'interaction de l'ARNI avec l'ARNII inhibe la maturation de l'ARNII en une forme nécessaire à l'initiation de la réplication du plasmide. Cette interaction est 30 modulée par la protéine ROP dont le gène est présent sur pBR322 mais pas sur certains dérivés tels que les plasmides de type pUC (Lin-Chao et Cohen, 1991, Cell 65 : 1233-1242). En matière de régulation du nombre de copies du plasmide d'expression chez *E. coli*, plusieurs stratégies sont citées (Swartz, 1996, précité; Makrides, 1996, précité).

On retiendra notamment qu'un fort nombre de copies de plasmide d'expression conduit à un niveau élevé d'ARN messagers de la protéine désirée, mais peut être pénalisant pour le métabolisme de la souche hôte (Bailey, 1993, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 48 : 29-52).

5 La stabilité des plasmides d'expression est un critère important d'autant plus que les fermentations industrielles tendent à ne pas utiliser d'antibiotiques dans les fermenteurs. Plusieurs stratégies ont été développées pour stabiliser les plasmides d'expression dont le clonage du locus *cer* du plasmide naturel *ColE1*. Ce locus a été caractérisé (Leung *et al.*, 1985, *DNA* 4 : 351-355) et son insertion sur des plasmides 10 multi-copies a été décrite comme ayant un effet bénéfique sur la stabilité de ces plasmides (Summers et Sherratt, 1984, *Cell* 36 : 1097-1103).

15 Si les souches et les systèmes d'expression ci-dessus permettent d'obtenir de bons rendements de production de protéines hétérologues, leur emploi reste limité à la production de protéines hétérologues à très haute valeur ajoutée pour lesquelles le prix de revient du système de production (souche bactérienne, milieu et conditions de culture, matières premières) est minime comparé à la valeur de la protéine produite. 20 Comme exemples de telles protéines à très haute valeur ajoutée, on trouve plus particulièrement les protéines hétérologues destinées à un usage pharmaceutique comme par exemple l'hormone humaine de croissance, l'interféron humain consensus alpha, les interleukines humaines 1 $\beta$ ,  $\alpha$ 1, 2, l'interféron leucocytaire humain, l'hormone parathyroïdique humaine, l'insuline humaine, l'albumine sérique humaine, la Proapolipoprotéine humaine A-1 (Lee, 1996, *Trends in Biotechnol.* 14:98-105 ; Latta *et al.*, 1987, *Bio/Technology* 5 :1309-1313).

25 Toutefois, pour la production d'intermédiaire chimique de masse (Lee, 1997, *Nature Biotech.* 15 :17-18) ou pour la production d'enzymes à usage industriel, notamment des catalyseurs nécessaires à la production de composés chimiques, le prix de revient du système de production devient un facteur dominant à prendre en considération pour évaluer l'intérêt technique du dit système.

30 Pour la production de protéines hétérologues dans des bactéries, la productivité du système de culture employé peut être significativement augmentée en utilisant des stratégies de culture à haute densité cellulaire (S. Makrides, 1996, précité; Wingfield, 1997, précité). Parmi celles-ci se trouve la stratégie de fed-batch (Jung *et al.*, 1988, *Ann. Inst. Pasteur /Microbiol.* 139 : 129-146 ; Kleman *et al.*, 1996, *Appl. Environ. Microbiol.*

62 : 3502-3507 : Lee, 1996, précité ; Bauer et White, 1976, Biotechnol. Bioeng. 18 : 839-846). Cette stratégie, combinée à l'utilisation d'un promoteur  $P_{trp}$ , a permis d'atteindre des productivités importantes : 55 g de poids sec par litre et 2.2 g de protéine hétérologue par litre (Jung *et al.*, 1988, précité). Il est fait état de productions en routine de 35 à 50 g de poids sec par litre (Wingfield, 1997, précité).

5 Cependant, les souches et systèmes ci-dessus ne permettent pas d'obtenir des densités de culture suffisantes pour la production industrielle de protéines hétérologues dont la valeur (prix de revient) doit être négligeable au regard de leur finalité (notamment pour la préparation de catalyseurs biologiques).

10 La présente invention réside dans la sélection d'une souche de *E. coli* particulière, appropriée pour la production industrielle de protéines hétérologues. La souche utile pour le procédé selon l'invention est une souche *E. coli* W, plus particulièrement la souche W référencée à l'ATCC sous le numéro 9637.

15 Cette souche W (ATCC 9637), est bien connue et décrite dans de nombreuses publications (Davies & Mingioli, 1950, J. Bact., 60: 17-28 ; Doy et Brown, 1965, Biochim. Biophys. Acta, 104: 377-389 ; Brown et Doy, 1966, Biochim. Biophys. Acta, 118: 157-172 ; Wilson & Holden, 1969, J. Biol. Chem., 244: 2737-2742 ; Wilson & Holden, 1969, J. Biol. Chem., 244: 2743-2749 ; White, 1976, J. Gen. Microbiol., 96: 51-62 ; Shaw & Duncombe, 1963, Analyst 88: 694-701 ; Br. Pharmacopoeia, 1993, 2: 20 A164-A169 ; Huang *et al.*, US 3.088.880; Hamsher *et al.*, US 3,905,868; Takahashi *et al.*, US 3,945,888; Huang *et al.*, US 3,239,427; Burkholder, 1951, Science, 114: 459-460 ; Prieto *et al.*, 1996, J. Bact., 178: 11-120 ; Lee 1996, précité; Lee & Chang, 1995, Can. J. Microbiol. 41: 207-215; Lee *et al.*, 1994, Biotechnol. Bioeng., 44: 1337-1347 ; Lee & Chang, 1993, Biotechnology Letters, 15: 971-974; Bauer et White, 1976, précité; 25 Bauer et Shiloach, 1974, Biotechnol. Bioeng. 16: 933-941 ; Gleiser et Bauer, 1981, Biotechnol. Bioeng., 23: 1015-1021 ; Lee et Chang, 1995, Advances in Biochem. Engine./Biotech. 52 : 27-58). La souche W (ATCC9637) a ainsi été utilisée pour la production d'acide 3-polyhydroxybutyrique (PHA) après introduction d'un plasmide portant l'opéron d'*Alcaligenes eutrophus* codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse du PHA (Lee et Chang, 1993, précité; Lee et Chang, 1995, précité ; Lee et al., 1994).

30 La souche W a aussi été utilisée en cultures à haute densité cellulaire (Bauer et White, 1976, précité; Bauer et Shiloach, 1974, précité ; Gleiser et Bauer, 1981, précité ;

Lee et Chang, 1993, précité ; Lee et al., 1997, *Biotechnology Techniques* 11 : 59-62 ). Des biomasses de 125 g de poids sec par litre ont ainsi pu être obtenues (Lee et Chang, 1993, précité) en utilisant du saccharose comme source carbonée.

Toutefois, cette souche n'a jamais été décrite pour la production de protéines recombinantes. En outre, en combinant un plasmide portant l'opéron *d'Alcaligenes eutrophus* codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse du PHA et une stratégie de culture à haute densité cellulaire de la souche W recombinante correspondante, Lee et Chang (1993, précité) ont obtenu de moins bonnes productivité de PHA qu'avec une souche XL1-Blue dérivée de la souche K12 (Lee et Chang, 1995, précité ; Lee, 1996, précité).

La présente invention concerne donc un procédé industriel de préparation de protéines hétérologues dans *E. coli*, dans lequel on ensemence et on cultive dans un milieu de culture approprié des bactéries *E. coli* modifiées avec un système d'expression de protéines hétérologues approprié, caractérisé en ce que la souche de *E. coli* est une souche *E. coli* W. Plus préférentiellement la souche W est la souche W déposée à l'ATCC sous le numéro 9637.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la souche W est un dérivé de la souche déposée à l'ATCC sous le numéro 9637 obtenu par sélection clonale ou manipulation génétique.

Par procédé industriel, on entend selon l'invention tout procédé dont le volume de culture des bactéries est supérieur au volume de culture usuel employé dans les laboratoires de recherche. De manière générale, on entend par procédé industriel tout procédé pour lequel le volume de culture est supérieur à 2 litres, de préférence supérieur ou égal à 10 litres, plus préférentiellement supérieur ou égal à 20 litres, encore plus préférentiellement supérieur ou égal à 50 litres. Le procédé selon l'invention est particulièrement approprié pour des volumes de culture de plusieurs dizaine de m<sup>3</sup>, jusqu'à plus de 100 m<sup>3</sup>.

Le milieu de culture approprié est un milieu de culture approprié pour l'obtention d'une forte densité de biomasse et une forte teneur en protéines hétérologues produites. Plusieurs types de milieux (définis, complexes et semi-définis) peuvent être utilisés pour la culture à haute densité cellulaire (Lee, 1996, précité). Si les milieux connus de l'état de la technique et en particulier les milieux semi-définis permettent de cumuler une bonne reproductibilité de la composition du milieu et une bonne

productivité de la culture (Lee, 1996, précité) le développement d'un tel milieu requiert toutefois une optimisation empirique pour la prise en compte des contraintes économiques énoncées auparavant (Lee, 1996, précité).

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, le milieu de culture comprend du saccharose comme principale source de carbone. Par principale source de carbone, on entend selon l'invention que le saccharose représente au moins 50 % en poids du poids total des sources de carbone du milieu de culture, plus préférentiellement au moins 75 % en poids, encore plus préférentiellement au moins 85 % en poids. Selon un mode plus préférentiel de réalisation de l'invention, le milieu de culture ne comprend 10 substantiellement que du saccharose comme source de carbone. Il est entendu que pour le procédé selon l'invention, le milieu de culture peut comprendre des additifs appropriés de manière à augmenter le rendement global de l'invention. Ces additifs peuvent avoir comme fonction annexe de se comporter comme source de carbone à la culture des bactéries. Toutefois, ces additifs ne seront pas considérés comme source de carbone au sens de la présente invention si les bactéries *E coli* W employées dans le procédé selon l'invention ne peuvent croître sur lesdits additifs comme seule source de carbone. 15

De manière avantageuse, la quantité de saccharose dans le milieu de culture du procédé selon l'invention est comprise entre 0,1 et 300 g/l en début de culture (avant 20 l'ensemencement), de préférence entre 0,5 et 200 g/l. Il est entendu que le saccharose constituant la principale source de carbone du milieu selon l'invention, la quantité de saccharose ira diminuant au cours du procédé. En général, en fin de réaction la quantité de saccharose dans le milieu de culture en fin de réaction est comprise entre 0 et 10 g/l.

Selon un mode avantageux de réalisation de l'invention, le milieu de culture approprié comprend en outre une source d'azote organique complémentaire. Cette source d'azote organique complémentaire peut être constituée par toutes les sources d'azote organique connues de l'homme du métier. De préférence, la source d'azote organique complémentaire est constituée par des extraits protéiques. Ces extraits protéiques ont plus préférentiellement la composition suivante : (en g acides aminés pour 100g de produit) Alanine entre 10 et 4, Aspartique entre 11 et 4, Glycine entre 22 et 2,5 et Lysine entre 7 et 4. Les peptones ou protéines de viande ou de pomme de terre répondent à un tel profil et sont particulièrement préférées pour le procédé selon l'invention, plus particulièrement les dérivés de protéines de pomme de terre. 30

Par système d'expression de protéines hétérologues approprié, on entend selon l'invention tout système d'expression comprenant des éléments de régulation appropriés pour l'expression de protéines hétérologues dans *E. coli* W. Ces éléments de régulation comprennent notamment les promoteurs, les sites de fixation aux ribosomes, les 5 terminateurs de transcription.

De manière avantageuse, le système d'expression comprend un promoteur  $P_{trp}$ . Le promoteur  $P_{trp}$  a été utilisé dans plusieurs exemples (Demande EP 0 198 745 ; Demande CIP N° 08/194,588 ; Demande WO 97/04083 ; Latta *et al.*, 1987, Bio/Technology 5 : 1309-1314 ; Denèfle *et al.*, 1987, Gene 56 : 61-70). En particulier, 10 Latta *et al.* (1990, DNA Cell. Biol. 9 : 129-137) ont conduit une étude détaillée sur l'influence de séquences régulatrices en amont du promoteur, de séquences promotrices dupliquées en tandem et sur l'influence de la coexpression du répresseur TrpR. Leur construction de référence, pXL534, a servi de base à la construction de pXL642 (Demande CIP N° 08/194,588) utilisée dans les exemples qui illustrent la présente 15 invention. De manière préférentielle, le promoteur  $P_{trp}$  comprend la séquence d'acides nucléiques représentée par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1).

Selon un mode de réalisation de l'invention, pour améliorer le niveau d'expression de la protéine hétérologue, on effectue une coexpression des chaperons moléculaires d'*E. coli* GroESL (revue par Makrides, 1996, précité). L'augmentation de 20 la concentration intracellulaire des protéines GroESL permet en effet d'assister le repliement de la protéine recombinante et améliore ainsi le taux de protéine active (Weicker *et al.*, 1996, Curr. Opin. Biotechnol. 7 : 494-499). Les gènes dont la coexpression favorise l'expression de la protéine hétérologue selon l'invention, et sa qualité, sont compris dans le système d'expression selon l'invention.

25 Par protéine hétérologue, on entend selon l'invention toute protéine produite par le procédé selon l'invention qui ne se trouve pas naturellement dans *E. coli* W, dans le système d'expression approprié selon l'invention. Il peut s'agir d'une protéine d'origine non bactérienne, par exemple d'origine animale, notamment humaine ou végétale, ou encore d'une protéine d'origine bactérienne non produite naturellement par 30 *E. coli* W, ou encore d'une protéine d'origine bactérienne produite naturellement par une autre bactérie que *E. coli* W ou bien encore d'une protéine produite naturellement par *E. coli* W, dont l'expression est contrôlée par des éléments de régulation distincts de

ceux du système d'expression selon l'invention, ou enfin d'une protéine dérivant des précédentes après modifications de certains éléments de sa structure primaire.

Bien entendu, le procédé selon l'invention s'applique à toute protéine d'intérêt dont la production nécessite une forte accumulation de protéines, avant soit de les extraire et de les purifier, totalement ou en partie, soit de les employer en mélange avec la biomasse qui aura permis de les produire. C'est le cas par exemple d'enzymes utiles pour la biocatalyse de réactions chimiques, qui peuvent être employés sans opération préalable d'isolement et de purification ou aussi d'enzymes qui sont utilisées dans la bactérie hôte en cours de croissance pour la biotransformation de composés chimiques.

De manière avantageuse, la protéine hétérologue est une enzyme, produite en quantités industrielles pour un usage ultérieur comme catalyseur de réactions chimiques. Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, l'enzyme est une nitrilase, avantageusement une nitrilase d'*Alcaligenes faecalis* (ATCC8750) décrite dans la demande de brevet WO 98/18941 ou une nitrilase de *Comamonas testosteroni* sp. décrite dans la demande CIP n°08/194,588, ou une amidase telle que celles décrites dans les demandes WO 97/04083, EP 433 117, EP 488 916, ou encore une hydroxyphenylpyruvate dioxygénase décrite dans la demande WO 96/38567.

La présente invention concerne également une souche *E. coli* W telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend un système d'expression de protéines hétérologues dont le promoteur est le promoteur *P<sub>trp</sub>* défini ci-dessus.

Les exemples ci-dessous permettent d'illustrer la présente invention, sans toutefois chercher à en limiter la portée.

Les figures 1 à 3 en annexe représentent des cartes de plasmides employés dans les différents exemples.

La figure 1 représente la carte du plasmide pRPA-BCAT41. Les sites entre parenthèse sont des sites qui ont été éliminés lors des clonages. *P<sub>trp</sub>* : promoteur tryptophane ; *nitB* : gène de la nitrilase ; *T<sub>trnB</sub>* : terminateurs de transcription ; fin ROP : fin du gène codant pour la protéine ROP (Chambers et al., 1988. Gene 68 : 139-149) ; ORI : origine de réplication ; RNAI/II : ARN impliqués dans la réplication ( Chambers et al., précité); *Tc* : gène de résistance à la tétracycline.

La figure 2 représente la carte du plasmide pRPA-BCAT127. Les sites entre parenthèse ont été éliminés lors des clonages. *P<sub>trp</sub>* : promoteur tryptophane ; *nitB* : gène de la nitrilase ; *T<sub>trnB</sub>* : terminateurs de transcription; ORI : origine de réplication ;

RNAI\*/II : ARN mutés impliqués dans la réplication; Cm : gène de résistance au chloramphénicol; cer : locus cer.

La figure 3 représente la carte du plasmide pRPA-BCAT103. Les sites entre parenthèse ont été éliminés lors des clonages. Sm/Sp : gène de résistance à la streptomycine et spectinomycine, parABCDE : locus par (Roberts et Helinski. 1992. J. Bacteriol. 174 : 8119-8132) ; rep, mob, D20 et ori : régions intervenant dans la réplication et le transfert du plasmide (Scholtz et al., 1989, Gene 75 : 271-288 ; Frey et al., 1992, Gene 113 : 101-106).

La figure 4 représente la carte du plasmide pRPA-BCAT126. P<sub>trp</sub> : promoteur tryptophane ; nitB : gène de la nitrilase ; T<sub>rrnB</sub> : terminateurs de transcription; ORI : origine de réplication ; RNAI\* /II : ARN mutés impliqués dans la réplication; Tc<sup>r</sup> : gène de résistance à la tétracycline; cer : locus cer .

La figure 5 représente la carte du plasmide pRPA-BCAT143. Sm/Sp : gène de résistance à la streptomycine et spectinomycine; rep, mob, et ori : régions intervenant dans la réplication et le transfert du plasmide (Scholtz *et al.*, 1989, Gene 75 : 271-288 ; Frey *et al.*, 1992, Gene 113 : 101-106) ; delta se rapporte au nom de la délétion décrite dans le texte.

Les techniques mises en oeuvre sont des techniques classiques de biologie moléculaire et de microbiologie, connues de l'homme de l'art et décrites par exemple par Ausubel *et al.*, 1987 (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York), Maniatis *et al.*, 1982, (Molecular Cloning : a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York), Coligan *et al.*, 1997 (Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, Inc).

25                   **Exemple 1 : Construction des plasmides d'expression pBCAT29 et**  
**pBCAT41.**

Le fragment de 1.27 kb contant le promoteur  $P_{trp}$ , le site de fixation du ribosome du gène cII du phage  $\lambda$  (RBScII) et le gène de la nitrilase d'*Alcaligenes faecalis* ATCC8750 (*nitB*) a été extrait du plasmide pRPA6BCAT6 (Demande FR 30 96/13077) à l'aide des enzymes de restriction EcoRI et XbaI pour être cloné dans le vecteur pXL642 (décrit dans la demande CIP N°08/194,588) ouvert par les mêmes enzymes de restriction. Le plasmide résultant, pRPA-BCAT15 a été ouvert par les enzymes S11 et BsmI et le fragment de 4,3 kb a été ligaturé avec le fragment S11-BsmI

de 136 bp purifié de pRPA-BCAT4 (Demande FR 96/13077) pour conduire au plasmide pRPA-BCAT19. Le séquençage partiel de pRPA-BCAT19 a confirmé le remplacement du codon du résidu Asp279 de la nitrilase par le codon d'un résidu Asn279. Le fragment de 1,2 kb EcoRI-XbaI de pRPA-BCAT19 contenant la fusion 5  $P_{trp} : :RBScII : :mitB$  a été ensuite cloné dans le vecteur pRPA-BCAT28 ouvert par les mêmes enzymes pour conduire au plasmide pRPA-BCAT29 de 6,2 kb. Le vecteur pRPA-BCAT28 a été obtenu en ligaturant le fragment de 3,9 kb SspI-Scal de pXL642 (demande CIP N°08/194,588) avec le fragment de 2,1 kb SmaI de pHP45ΩTc (Fellay *et al.*, 1987, Gene 52 : 147-154) afin de remplacer le marqueur de résistance à 10 l'ampicilline par le marqueur de résistance à la tétracycline. En détruisant le site NdeI proche de l'origine de réplication du plasmide pRPA-BCAT29 par digestion partielle NdeI et action de la Polymérase I d'*E. coli* (Fragment de Klenow), le plasmide pRPA-BCAT41 a été obtenu dont une carte est représentée sur la figure 1. La séquence de la cassette d'expression est représentée par l'identificateur de séquence n° 2 (SEQ ID NO 15 2).

**Exemple 2 : Expression de la nitrilase d' *A. faecalis* ATCC 8750 chez *E. coli* K12, BL21, W en « batch ».**

Les plasmides pRPA-BCAT29 et pXL2035 (Levy-Schill *et al.*, 1995, Gene 161 : 20 15-20) ont été introduits dans les souches d'*E. coli* DH5 $\alpha$  (CLONECH, Référence produit C1021-1), BL21 (Novagen, référence produit 69386-1) et W (ATCC9637) par électroporation classique. Des cultures d'expression ont été réalisées comme décrit dans l'exemple 5 de la demande FR 96/13077 en réduisant le temps de préculture à 8 heures et en fixant le temps d'expression à 16 heures. Les biomasses après expression ont été 25 estimées d'après la densité optique des cultures lue à 660 nm (DO660) en utilisant la relation suivante : biomasse en gramme de poids sec par litre de culture = DO660 x 0,35. Les mesures d'activité nitrilasique des cultures ont été réalisées comme décrit dans la demande FR 96/13077. Pour chaque souche, deux clones ont été analysés et pour chaque clone, l'expérience a été répétée. Le tableau 1 contient pour chaque souche 30 la moyenne des données obtenues dans les quatre expériences.

**Tableau 1 : Biomasse et activités des souches hébergeant les plasmides pRPA-BCAT29 et pXL2035**

SOUCHE	BIOMASSE (g/l)	ACTIVITE (U)	PRODUCTIVITE (P)
DH5 $\alpha$	0,15	10,4	1,6
BL21	0,37	6,3	2,4
W	0,65	7,0	4,5

ABREVIATIONS : g/l : gramme de poids sec par litre de culture ; U : kg d'HMTBA formé par heure et par kg de poids sec ; P : kg d'HMTBA formé par heure et par litre de culture

5 Ces données montrent que la souche d'*E. coli* W (ATCC9637) est plus performante pour exprimer la nitrilase NitB.

#### Exemple 3 : Construction de pBCAT43.

Le gène de la polyamide hydrolase de *Comamonas acidovorans* N12 décrit dans 10 la demande WO 97/04083 (*pamII*) a été cloné dans le vecteur pBCAT41. En introduisant dans les amorces de PCR les sites de restriction EcoRI et NcoI en position 5' du gène et XbaI en position 3', le gène de cette polyamide hydrolase a été amplifié par PCR sous la forme d'un fragment d'ADN de 1,26 kb. Ce fragment a ensuite été traité successivement par l'enzyme EcoRI et la nucléase Mung Bean. Après extraction 15 des protéines au phenol-chloroforme-alcool isoamilique, le traitement s'est poursuivi avec une digestion XbaI. De façon similaire, le vecteur pRPA-BCAT41 a été ouvert avec l'enzyme NdeI puis traité à la nucléase Mung Bean. Après extraction des protéines au phenol-chloroforme-alcool isoamilique, le traitement s'est poursuivi avec une digestion XbaI. Après ligature des ces deux échantillons, le plasmide pRPA-BCAT43 a 20 été obtenu : il contient le promoteur *Ptrp*, le site de fixation RBScII, séparé du codon d'initiation de la traduction du gène *pamII* par la séquence : AATACTTACACC.

#### Exemple 4 : Expression de la polyamidase PamII chez *E. coli* DH5 $\alpha$ , BL21 et W en « batch ».

25 Le plasmide pRPA-BCAT43 a été introduit dans les souches d'*E. coli* DH5 $\alpha$ , L21 et W par électroporation classique. Des cultures d'expression ont été réalisées comme décrit dans l'exemple 2 ci-dessus et en variant le temps d'expression de 14 à 24

heures. Les biomasses après expression ont été estimées comme dans l'exemple 2 ci-dessus. Les mesures d'activité polyamide hydrolase des cultures ont été réalisées comme décrit dans la demande WO 97/04083 avec les modifications suivantes :

- les cellules ont été perméabilisées avec du toluène en resuspendant les culots cellulaires dans un tampon 100mMtris-HCl, 5 mM EDTA pH8, toluène 1% de façon à avoir une concentration en cellules sèches d'environ 5 g/l ; après une vigoureuse agitation, la suspension est incubée une heure à 4°C puis centrifugée et enfin les culots de cellules perméabilisées sont repris dans un tampon phosphate 100 mM , pH7.
- l'activité d'hydrolyse a été mesurée sur l'oligomère AB (une molécule d'acide adipique condensée à une molécule d'hexaméthylène diamine) présent à 2,5 g/l dans le milieu réactionnel contenant du tampon phosphate de potassium 0,1 M à pH7 et incubé à 30°C sous agitation :
- des prélèvements de 100 microlitres sont faits à intervalles réguliers en leur ajoutant le même volume de NaOH 0,2 N ;
- les échantillons sont analysés par HPLC après dilution au dixième dans une solution d' $H_3PO_4$  à 50 mM.

Pour chaque souche, de 1 à 24 clones ont été analysés et pour chaque clone, une à sept expériences indépendantes ont été conduites. Le tableau 2 contient pour chaque souche la moyenne des données obtenues.

20

*Tableau 2 : Biomasse et activités des souches hébergeant le plasmide pRPA-BCAT43*

SOUCHE	NB CULTURES	ACTIVITE (U)	PRODUCTIVITE (P)
DH5a	11	0,77	0,3
BL21	3	1,4	1,8
W	24	2,1	2,6

ABREVIATIONS : NB : nombre ; U : g d'AB hydrolysé par heure et par g de poids sec ; P : g d'AB hydrolysé par heure et par litre de culture

25 Ces données montrent que la souche d'*E. coli* W (ATCC9637) est plus performante pour exprimer la polyamidase PamII.

**Exemple 5 : Construction et caractérisation du plasmide pBCAT41-531.**

Le plasmide pRPA-BCAT41 a subi une étape de mutagenèse réalisée avec de l'hydroxylamine comme décrit dans Miller 1992 (Mutagenesis. A short course in bacterial genetics. « A laboratory manual and handbook for *E. coli* and related bacteria », Cold Spring Harbour Laboratory Press, Unit 4, pp81-212) et Humphreys *et al.*, 1976 (Mol. Gen. Genet. 145 : 101-108). Cinq microgrammes d'ADN plasmidique purifié sur gradient de chlorure de Césium ont été incubés 20 minutes à 80°C dans un tampon phosphate de sodium 50 mM pH6 contenant 0,5 mM EDTA et 0,4 M NH<sub>2</sub>OH.

Après ajout d'un volume identique de tampon phosphate de sodium 50 mM pH6 contenant 0,5 mM EDTA, le mélange réactionnel a été dialysé contre un large excès de tampon Tris-HCl 10 mM pH7,5 contenant 1 mM EDTA et 100 mM NaCl. L'ADN plasmidique a ensuite été récupéré par précipitation et environ 20 ng d'ADN a été introduit par électroporation dans la souche DH5 $\alpha$  hébergeant le plasmide pXL2035.

Parmi les transformants obtenus, un clone a été sélectionné à cause d'une productivité de la culture 3 fois supérieure à celle d'une culture de la souche DH5 $\alpha$  (pRPA-BCAT41, pXL2035). Le plasmide pRPA-BCAT41-531 qu'il hébergeait a été extrait et réintroduit dans un nouvel hôte DH5 $\alpha$  hébergeant le plasmide pXL2035. Trois clones ont alors été analysés dans les conditions décrites dans l'exemple 2 en les comparant à 3 clones DH5 $\alpha$  (pRPA-BCAT41, pXL2035) et les résultats sont présentés dans le tableau dans le tableau 3.

**Tableau 3 : Biomasse et activités des souches hébergeant les plasmides pRPA-BCAT41, pRPA-BCAT41-531 et pXL2035**

25

Souches	Biomasse (g/l)	Activité (U)	Productivité (P)
DH5 $\alpha$ (pRPA-BCAT41, pXL2035)	0,21	12	2,5
DH5 $\alpha$ (pRPA-BCAT41-531, pXL2035).	0,63	12	7,5

ABREVIATIONS : g/l : gramme de poids sec par litre de culture ; U : kg d'HMTBA formé par heure et par kg de poids sec ; P : kg d'HMTBA formé par heure et par litre de culture.

5 Ces résultats indiquent que l'amélioration de la productivité des cultures est corrélée à la présence du plasmide pRPA-BCAT41-531.

Le fragment de 1,27 kb EcoRI-XbaI contenant la fusion *P<sub>trp</sub> : nitB* a été extrait du plasmide pRPA-BCAT41 pour être cloné à la place de celui contenu dans pRPA-BCAT41-531. Le plasmide résultant, pRPA-BCAT86 a été introduit dans la souche DH5 $\alpha$  (pXL2035) et 3 transformants ont été étudiés dans des conditions similaires à celles décrites ci-dessus. Les résultats sont regroupés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Biomasse et activités des souches hébergeant les plasmides pRPA-BCAT41, pRPA-BCAT41-531, pRPA-BCAT86 et pXL2035

Souches	Biomasse (g/l)	Activité (U)	Productivité (P)
DH5 $\alpha$ (pRPA-BCAT41, pXL2035)	0,20	13,8	2,7
DH5 $\alpha$ (pRPA-BCAT41-531, pXL2035)	0,68	11,0	7,4
DH5 $\alpha$ (pRPA-BCAT86, pXL2035)	0,69	11,9	8,1

15 ABREVIATIONS : g/l : gramme de poids sec par litre de culture ; U : kg d'HMTBA formé par heure et par kg de poids sec ; P : kg d'HMTBA formé par heure et par litre de culture

20 Les résultats montrent que l'amélioration de la productivité des cultures hébergeant pRPA-BCAT41-531 n'est pas due à une amélioration de l'activité spécifique de la souche et que cette amélioration n'est pas causée par une mutation dans le fragment portant le promoteur *P<sub>trp</sub>* et le gène *nitB*.

25 Exemple 6 : Caractérisation d'une mutation portée par le plasmide pBCAT41-531 responsable de l'amélioration de la productivité des cultures de souches exprimant la nitrilase.

L'analyse de la quantité de protéine produite par les souches de l'exemple 5 par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS a montré que toutes ces constructions conduisaient à des taux de synthèse de polypeptide nitrilasique comparables entre les souches décrites dans cet exemple. En revanche, des préparations d'ADN plasmidique de pRPA-BCAT41 et pRPA-BCAT41-531 réalisées à partir de quantités de biomasse équivalentes ont mis en évidence que le plasmide pRPA-BCAT41-531 est présent à plus faible nombre de copie que son parent pRPA-BCAT41. Le séquençage de la région de 994 bp de pRPA-BCAT41-531 qui s'étend depuis le site *Tth111I* et qui couvre l'origine de réPLICATION du plasmide a mis en évidence deux différences par rapport à la séquence de la région correspondante de pBR322 (GeneBank #J01749, nom : SYNPBR322). En se référant à la numérotation donnée dans la séquence J01749 (0 est le milieu de l'unique site EcoRI), nous avons trouvé qu'une insertion d'un A avait eu lieu après la base 2319 et que le C de la position 3039 est remplacé par un T chez pRPA-BCAT41-531. La première différence est imputable à une erreur lors de l'action de la polymerase Klenow qui a servi à détruire un des sites *NdeI* de pRPA-BCAT29 et se situe dans une région qui n'est pas décrite comme jouant un rôle dans la réPLICATION de pBR322 (Chambers *et al.*, 1988, Gene 68 : 139-149). La deuxième erreur correspond à une transition, effet caractéristique de l'hydroxylamine sur l'ADN (Drake et Baltz, 1976, Annu. Rev. Biochem. 45 : 11-37), et se situe au niveau du deuxième nucléotide de la région transcrrite en ARN 1 impliquée dans la réPLICATION de pBR322 (Chambers *et al.*, précité). C'est cette dernière mutation qui est responsable du plus faible nombre de copies de pRPA-BCAT41-531 dans DH5 $\alpha$  et qui est responsable de la meilleure productivité nitrilasique des cultures de la souche DH5 $\alpha$  (pRPA-BCAT41-531, pXL2035).

25

**Exemple 7 : Expression de la nitrilase de *A. faecalis* ATCC 8750 chez *E. coli* BL21 et *E. coli* W en « fed-batch » (culture semi-continu).**

Les plasmides pRPA-BCAT41-531 et pXL2035 ont été introduits par électroporation dans les souches BL21 (référence précitée) et W (ATCC9637) pour donner respectivement les souches RPA-BIOCATE594 [BL21 (pRPA-BCAT41-531, pXL2035)] et RPA-BIOCATE714 [W (pRPA-BCAT41-531, pXL2035)]. Les recombinants *E. coli* BIOCATE 594 et *E. coli* BIOCATE 714 ont été cultivés dans des

fermenteurs de 3,5 litres contenant 2 litres de milieu dont la composition est la suivante :

Composé	Concentration en g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,75
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,5
Sulfate de fer	0,04
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,05
Sulfate de manganèse	0,01
Chlorure de Co	0,004
Sulfate de Zn	0,002
Molybdate de Na	0,002
Chlorure de cuivre	0,002
Acide borique	0,0005
Citrique.H <sub>2</sub> O	1,7
Glucose monohydraté	95
L-tryptophane	0,1
Peptone de viande	5
Extrait de levure	3

Le pH est maintenu à 7,0 par ajout d'ammoniaque. La saturation en oxygène est 5 maintenue à 20% par ajout d'air à raison de 1 volume/ volume de milieu/ minute et par agitation. Le glucose est introduit au début à une concentration finale de 2 g/l. Après être totalement consommé, il est introduit de manière continu à partir d'une solution mère dont la composition est la suivante : glucose 700 g/l ; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 19,6 g/l. La vitesse d'addition est de 2,2 g de glucose/h. l de milieu.

10 Après 24 heures de fermentation, le milieu est récupéré, centrifugé et le poids sec est estimé en g/l. L'activité enzymatique est mesurée suivant un protocole donné dans le brevet WO96/09403. Elle est exprimée en kilos de 3-hydroxybutanoate d'ammonium formées par heure et par kilo de cellules sèches.

Souche	Biomasse finale	Activité finale	Rendement sur glucose
BIOCAT 594 (BL21)	27 g/l	13	23%
BIOCAT 714 (W)	40 g/l	17	40%

Il apparaît clairement dans cet exemple, que la nitrilase s'exprime beaucoup mieux dans *E. coli* W que dans *E. coli* BL21 et que le recombinant *E. coli* W BIOCAT 714 pousse beaucoup mieux que le recombinant *E. coli* BL21 BIOCAT 594.

**Exemple 8 : Influence de la source d'azote organique d'origine animale.**

La souche E. coli W BIOCAT 714 est cultivée dans un fermenteur de 3,5 litres contenant 2 litres de milieu dont la composition est la suivante :

5

Composé	Concentration dans le milieu en g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,75
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,5
Sulfate de fer	0,04
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,04
Sulfate de manganèse	0,026
Chlorure de Co	0,004
Sulfate de Zn	0,013
Molybdate de Na	0,001
Chlorure de cuivre	0,001
Acide borique	0,00025
AlCl <sub>3</sub>	0,00125
Citrique.H <sub>2</sub> O	1,7
Glucose monohydraté	95
L-tryptophane	0,1
Extrait de levure	3

10

Le pH est maintenu à 7,0 par ajout d'ammoniaque. La saturation en oxygène est maintenue à 20% par ajout d'air à raison de 1 volume/ volume de milieu/ minute et par agitation. Le glucose est introduit au début à une concentration finale de 2 g/l. Après être totalement consommé, il est introduit de manière continu à partir d'une solution mère dont la composition est la suivante : glucose 700 g/l ; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 19,6 g/l. La vitesse d'addition est de 2,2 g de glucose/h. l de milieu.

A ce milieu, on ajoute une source d'azote organique d'origine animale.

Source d'azote organique d'origine animale	Biomasse finale	Activité finale	Rendement sur glucose
Aucune	30	2	40%
2,5 g/ l de peptone de viande	33	12	40%
5 g/ l de peptone de viande	40	25	45%
5 g/ l de caséine	35	20	43%

L'utilisation de concentration croissante en azote organique d'origine animale augmente de manière significative l'activité spécifique des cellules.

5

**Exemple 9 : Influence de l'azote organique d'origine végétale.**

Les conditions de culture sont identiques à celles de l'exemple 8. Dans cet exemple, on ajoute de l'azote organique d'origine végétal.

Source d'azote organique d'origine végétale	Biomasse finale	Activité finale	Rendement sur glucose
Aucune	30	2	40%
5 g/ l de peptone de soja	31	4	40%
5 g/ l de peptone de blé	32	5	40%
7,5 g/ l d'hydrolysat sodique de protéine de pomme de terre (Alburex SP ; Roquette)	35	17	43%

10

L'ajout d'azote organique végétal ne donne pas des résultats identiques suivant l'origine.

De manière surprenante, l'ajout de protéine de pomme de terre, donne d'aussi bon résultat que l'azote organique d'origine animale.

15

**Exemple 10 : influence de la source de carbone.**

La souche E. coli W BIOCAT 714 est cultivée dans un fermenteur de 3,5 litres contenant 2 litres de milieu dont la composition est la suivante :

Composé	Concentration dans le milieu en g/ l
Trempe de Maïs	40
LAB2218 (Roquette)	
Extrait de levure	3
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,5

Le pH est maintenu à 7,0 par ajout d'ammoniaque. La saturation en oxygène est maintenue à 20% par ajout d'air à raison de 1 volume/ volume de milieu/ minute et par agitation. La source de carbone est introduite au début à une concentration finale de 2 g/ l. Après être totalement consommé, elle est introduite de manière continu à partir d'une solution mère dont la composition est la suivante : source de carbone 700 g/ l ; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 19,6 g/ l. La vitesse d'addition est de 2,2 g de glucose ou de saccharose/h. l de milieu.

La source de carbone est variée dans cet exemple.

Source de carbone	Biomasse finale	Activité finale	Rendement sur carbone
Glucose monohydraté 90 g/ l	38	11	45%
Sirop zéro (EUROSUCRE) 90 g/ l	38	17	45%

Dans cet exemple, on observe que l'emploi de saccharose (sirop zéro) comme source de carbone augmente de manière significative l'activité spécifique des cellules.

15

#### **Exemple 11 : Construction d'un plasmide de co-expression du régulateur TrpR**

Un fragment d'ADN de 434 bp porteur du gène *trpR* et de son promoteur a été extrait du plasmide pRPG9 (Gunsalus et Yanofsky, 1980, Proc. Natl. Aca. Sci. USA 77 : 7117-7121) à l'aide des enzymes de restriction AatII et StuI. Ce fragment a été cloné dans le plasmide pSL301 (Brosius, 1989, DNA 8 : 759-777) en le ligaturant au fragment d'environ 3,1 kb AatII-StuI pour donner le plasmide pRPA-BCAT30. Le gène *trpR* et son promoteur ont alors été extraits de pRPA-BCAT30 sous la forme d'un fragment d'EcoRI-NotI de 475 bp pour être cloné dans le plasmide pXL2035 à la place

d'un fragment de 240 bp EcoRI-Noil. Le plasmide résultant, pRPA-BCAT34, est donc un dérivé de pKT230 permettant l'expression des chaperons GroESL et du régulateur TrpR.

5                   **Exemple 12 : Influence de la co-expression de GroESL et de TrpR .**

Le plasmide pRPA-BCAT34 a été introduit par électroporation dans les souches DH5 $\alpha$  (pRPA-BCAT29), BL21 (pRPA-BCAT29) et W (pRPA-BCAT29). Des cultures d'expression de différentes souches ont été menées comme décrit dans l'exemple 2 et les résultats sont présentés dans le tableau 5.

10

*Tableau 5 : Biomasse et activités des souches hébergeant des combinaisons les plasmides pRPA-BCAT29, pXL2035 et pRPA-BCAT34*

Combinaisons	pRPA-BCAT29		pRPA-BCAT29 pXL2035		pRPA-BCAT29 pRPA-BCAT34	
HOTE	U	P	U	P	U	P
DH5alpha	0,37	0,16	10,4	1,6	2,0	0,7
BL21	0	0,0	6,4	2,4	5,6	2,0
W	1,7	0,96	7,0	4,5	8,9	6,5

15                   ABREVIATIONS : U : Activité, kg d'HMTBA formé par heure et par kg de poids sec ; P : Productivité, kg d'HMTBA formé par heure et par litre de culture

20                   Les résultats montrent que la coexpression de GroESL permet d'augmenter la productivité des cultures quelle que soit la souche considérée en améliorant l'activité spécifique des cultures. Cet effet est corrélé avec une augmentation de la solubilité du polypeptide nitrilasique comme le montre une analyse des protéines par électrophorèse telle que décrite dans la demande FR 96/13077. L'effet de la coexpression du régulateur TrpR est variable selon les souches mais permet chez W d'améliorer la productivité des cultures.

**Exemple 13 : Influence de la présence d'un locus *cer* sur pRPA-BCAT41**

Le fragment de 382 bp HpaII contenant le locus *cer* du plasmide ColE1 (Leung *et al.*, 1985, DNA 4 : 351-355) a été cloné dans la forme replicative du phage M13mp7 au niveau d'un des 2 sites AccI. La construction obtenue a alors permis d'extraire avec 5 l'enzyme EcoRI un fragment d'environ 430 bp contenant le locus *cer* qui a été cloné dans pRPA-BCAT41 au site EcoRI, ce qui a conduit au plasmide pRPA-BCAT66. Ce plasmide a été introduit par électroporation dans la souche W hébergeant le plasmide pRPA-BCAT34. Des cultures d'expression de différentes souches ont été menées comme décrit dans l'exemple 2 en allongeant la durée des cultures d'expression à 24 10 heures et en étudiant trois clones de chaque souche dans une unique expérience. Les résultats moyennés sont présentés dans le tableau 6.

*Tableau 6 : Biomasse et activités des souches hébergeant les plasmides pRPA-BCAT41, pRPA-BCAT66 et pRPA-BCAT34*

15

Souches	Biomasse (g/l)	Activité (U)	Productivité (P)
W (pRPA-BCAT41, pRPA-BCAT 34)	2,1	6,9	14,5
DH5 $\alpha$ (pRPA-BCAT66, pRPA-BCAT34)	1,8	10,0	18,0

ABREVIATIONS : g/l : gramme de poids sec par litre de culture ; U : kg d'HMTBA formé par heure et par kg de poids sec ; P : kg d'HMTBA formé par

20 Ces résultats montrent que l'ajout du locus *cer* sur le plasmide d'expression de la nitrilase conduit à améliorer la productivité des cultures.

**Exemple 14 : Construction du plasmide pRPA-BCAT127**

Après élimination du site unique NdeI du plasmide pRPA-BCAT30 par digestion et formation d'extrémités franches avec de la polymérase I (Fragment de Klenow), le gène *trpR* a été extrait de ce dernier plasmide sous la forme d'un fragment 25 d'environ 300 bp préparé par un traitement avec l'enzyme AatII suivi de l'action de la polymérase I (Fragment de Klenow), puis, après inactivation du mélange réactionnel,

par une digestion avec l'enzyme SacII. Ce fragment a été cloné dans le plasmide pRPA-BCAT66 après ouverture de celui-ci avec Tth111 suivi d'un traitement à la polymérase I Fragment de Klenow) et, après inactivation, avec SacII. Le plasmide pRPA-BCAT82 a ainsi été obtenu. Son origine de réPLICATION a été remplacée par celle du plasmide pRPA-BCAT41-531 en remplaçant le fragment Bst1107I-Eam1105I d'environ 1,12 kb. La construction sélectionnée lors de ce clonage, le plasmide pRPA-BCAT99, présente un artefact qui se manifeste sous la forme d'une délétion d'un nucléotide au niveau du site Eam1105I, transformant ce site en un site unique PshAI. Le marqueur de résistance du plasmide pRPA-BCAT99 a alors été changé en clonant entre les sites AatII et PshAI un fragment AatII-PshAI d'environ 1,07 kb préparé après amplification PCR du gène codant pour la résistance au chloramphénicol à partir de la matrice pACYC184 (New England Biolabs #401-M) en utilisant les amorces Cm1 et Cm2 dont la séquence est :

Cm1 : 5'-CCCCCGACAGCTGTCTGCTTCGAATTCTGCC

Cm2 : 5'-TTGACGTCAGTAGCTAACAGGAGGG

Le plasmide ainsi obtenu a été appelé pRPA-BCAT123. Il a été ensuite modifié en éliminant le gène *trpR* sous la forme d'un fragment SacI-Bst1107I d'environ 0,525 kb, et refermeture du plasmide après formation d'extrémités franches avec de la polymérase Pfu (15 minutes à 75°C dans le tampon recommandé par le fournisseur Stratagène et en présence de 0,2 mM de déoxynucléotides). Le plasmide ainsi obtenu est le plasmide pRPA-BCAT127 dont la carte est schématisée sur la figure 2.

#### Exemple 15 : Construction des plasmides pRPA-BCAT98 et pRPA-BCAT103 .

Le plasmide pRPA-BCAT37, décrit dans la demande FR 96/13077, a été modifié en remplaçant le fragment SfiI-Scal d'environ 3,2 kb par le fragment SfiI-Scal d'environ 2,42 kb du plasmide RSF1010D20 (Frey *et al.*, 1992, Gene 113 :101-106). Ce fragment contient une délétion dans la partie 5' du gène codant pour la primase RepB et réduit de 6 log la fréquence de transfert du plasmide (Frey *et al.*, précité). Le plasmide ainsi obtenu, pRPA-BCAT98, possède plusieurs avantages : la perte de ses fonctions de mobilisation le rend conforme aux règles de biosécurité industrielle tout en lui gardant ses caractéristiques de réPLICATION chez les bactéries Gram-négatives.

Le locus *par* (Gerlitz *et al.*, 1990, J. Bacteriol 172 : 6194-6203) a ensuite été cloné sur pRPA-BCAT98 comme suit. Le fragment SphI-BamHI d'environ 2,3 kb de pGMA28 (Gerlitz *et al.*, précité) a d'abord été cloné dans le vecteur pUC18, ce qui a permis de l'extraire sous la forme d'un fragment HindIII-EcoRI pour le cloner dans le vecteur pMTL22 (Chambers *et al.*, 1988, Gene 68:139-49). Le site HindIII a ensuite été détruit par digestion HindIII et traitement à la Klenow. Un fragment d'environ 2.38 kb a alors été extrait avec les enzymes PstI et BglII pour être cloné dans le vecteur pXL2426 aux sites PstI et BamHI et conduire au vecteur pXL2572. Le vecteur pXL2426 provient du remplacement du fragment de 2.38 kb SfiI-EcoRV de pXL2391 (demande FR 96/13077) par le fragment SfiI-EcoRV de 1.47 kb de RSF1010D20. Le clonage sur le plasmide pXL2572 aux sites NdeI et BamHI d'un fragment d'environ 0,960 bp NdeI-BamHI de pRR71 (Weinstein *et al.*, 1992, J. Bacteriol. 174 : 7486-7489) a permis de reconstituer le locus *par* en entier sur le plasmide pXL2573. Ce locus a alors été extrait de pXL2573 sous la forme d'un fragment de 2,6 kb EcoRI-extremité 10 franche (après traitement par PstI et Klenow) afin d'être cloné sur le plasmide pRPA-BCAT98 ouvert par EcoRI et SacI, cette dernière extrémité ayant été traitée par la polymerase Pfu. Le plasmide résultant a été appelé pRPA-BCAT103 et sa carte est schématisée sur la figure 3.

15

20 **Exemple 16 : Utilisation des plasmides pRPA-BCAT98, pRPA-BCAT103 et pRPA-BCAT127 pour l'expression de la nitrilase chez W.**

Les plasmides pRPA-BCAT127, pRPA-BCAT98, pRPA-BCAT103, pXL2035 et pXL2231 (demande FR 96/13077) ont été introduits dans la souche d'*E. coli* W par électroporation et des cultures d'expression ont été menées dans les conditions décrites dans l'exemple 2 en utilisant les antibiotiques suivants : Tétracycline 12 µg/ml pour pXL2231, kanamycine 50 µg/ml pour pXL2035, Streptomycine 100 µg/ml pour pRPA-BCAT98 et pRPA-BCAT103, Chloramphenicol 20 µg/ml pour pRPA-BCAT127. Pour chaque combinaison de plasmides, deux à trois clones ont été analysés et les résultats moyens sont présentés dans le tableau 7.

**Tableau 7 : Biomasse et activités des souches hébergeant les plasmides pRPA-BCAT41-531, pRPA-BCAT127, pRPA-BCAT98, pRPA-BCAT103, pXL2035 et pXL2231**

5

Combinaison	Biomasse (g/l)	Activité (U)	Productivité (P)
pBCAT127 / pXL2231	1,43	4,9	7
pBCAT127 / pBCAT 103	1,75	7	12
pBCAT127 / pBCAT98	1,72	11,2	19
pBCAT127 / pXL2035	1,70	7,2	12
pBCAT41-531 / pXL2035	1,36	5,9	8

ABREVIATIONS : g/l : gramme de poids sec par litre de culture ; U : kg d'HMTBA formé par heure et par kg de poids sec ; P : kg d'HMTBA formé par heure et par litre de culture

10

Les combinaisons pRPA-BCAT127/pRPA-BCAT98 et pRPA-BCAT127/pRPA-BCAT103 permettent une productivité au moins équivalente en utilisant des plasmides conformes aux critères de biosécurité européens.

15

**Exemple 17 : Construction du plasmide pRPA-BCAT126**

16

Le marqueur de résistance du plasmide pRPA-BCAT99 décrit dans l'exemple

17

14 a été changé comme suit. Le vecteur a été ouvert par les enzymes PshAI et AatII puis traité avec de la polymérase Pfu (5 min à 75°C dans le tampon recommandé par le fournisseur Stratagene et en présence de 0,2 mM de deoxynucléotides) et le fragment d'environ 3,95 kb a été extrait d'un gel d'agarose à l'aide du kit Quiaex (Quiagen) [d'autres systèmes de récupération d'ADN peuvent aussi être utilisés, notamment ceux de type chromatographique]. Il a été mis en ligation selon une méthode classique avec le fragment de 1,32 kb HindIII-BsmI extrait du plasmide pBR322 (New England Biolabs, ref 303-3S) puis traité comme ci-dessus avec la polymérase Pfu. Parmi les plasmides obtenus, le plasmide contenant l'insert porteur du gène de résistance à la tétracycline orienté dans le même sens de transcription que la cassette d'expression de la

20

nitrilase a été nommé pRPA-BCAT111. Ce plasmide a alors été ouvert par les enzymes NsiI et BstZ17I puis traité à la polymérase Pfu et religué afin d'éliminer le fragment de 0,47 kb porteur du gène *trpR*. Le plasmide obtenu a été nommé pRPA-BCAT126 dont une carte est représentée sur la figure 4.

5

#### Exemple 18 : Construction du plasmide pRPA-BCAT143

Le plasmide pRPA-BCAT98 décrit dans l'exemple 15 a été ouvert par les enzymes SfiI et ScaI pour remplacer le fragment de 2,42 kb porteur de la délétion dans la partie 5' du gène codant pour la primase RepB par le fragment de 2,96 kb SfiI-ScaI 10 extrait du plasmide RSF1010Δ18 portant une délétion en phase de 267 bp dans la partie 5' du gène *repB* ( Frey *et al.*, 1992, Gene 113 : 101-106). La délétion introduite sur pRPA-BCAT143 réduit la fréquence de transfert du plasmide à 10<sup>-6</sup> ( Frey *et al.*, 1992, Gene 113 : 101-106) et le rend conforme aux exigences des règles de biosécurité. Contrairement au plasmide pRPA6BCAT98 décrit précédemment, ce nouveau plasmide 15 conserve un nombre de copies voisin du plasmide non modifié pXL2035 (Lévy-Schill *et al.*, 1995, Gene 161 : 15-20). IL est représenté sur la figure 2.

#### Exemple 19 : Utilisation des plasmides pRPA-BCAT126 et pRPA-BCAT143 pour l'expression de la nitrilase chez W

20 Les plasmides pRPA-BCAT126, pRPA-BCAT127 (décrits ci-dessus), pRPA-BCAT143, pRPA-BCAT98, pXL2035 ont été introduits dans la souche d'*E. coli* W par électroporation et des cultures d'expression ont été menées dans les conditions décrites dans l'exemple 2 en utilisant les antibiotiques suivants : Tétracycline 12 µg/ml pour pRPA-BCAT41-531 et pRPA-BCAT126, kanamycine 50 µg/ml pour pXL2035, 25 Streptomycine 100 µg/ml pour pRPA-BCAT98 et pRPA-BCAT143, Chloramphénicol 20 µg/ml pour pRPA-BCAT127. Pour chaque combinaison de plasmides, deux à trois clones ont été analysés et les résultats moyens sont présentés dans le tableau 8.

30 *Tableau 8 : Biomasse et activités des souches hébergeant les plasmides pRPA-BCAT41-531, pRPA-BCAT126, pRPA-BCAT127, pRPA-BCAT98, pRPA-BCAT143, pXL2035.*

Combinaison	Biomasse (g/l)	Activité (U)	Productivité (P)
pBCAT41-531 / pXL2035	2,3	9,5	22
pBCAT41-531 / pBCAT143	2,5	8,9	22
pBCAT126 / pXL2035	2,2	9,8	21
pBCAT126 / pBCAT98	1,3	3,5	4,5
pBCAT126 / pBCAT 143	2,5	8,1	20
pBCAT127 / pBCAT143	2,8	7,1	20

ABREVIATIONS : g/l : gramme de poids sec par litre de culture ; U : kg d'HMTBA formé par heure et par kg de poids sec ; P : kg d'HMTBA formé par heure et par litre de culture

5

Contrairement au plasmide pBCAT98, les combinaisons du plasmide pRPA-BCAT143 avec l'un des plasmides pRPA-BCAT41-531, pRPA-BCAT127 ou pRPA-BCAT126 permettent de conserver la productivité des cultures réalisées avec les 10 souches hébergeant le plasmide pXL2035.

REVENDICATIONS

1. Procédé industriel de préparation de protéines hétérologues dans *E. coli*, dans lequel on ensemence et on cultive dans un milieu de culture approprié des bactéries *E. coli* modifiées avec un système d'expression de protéines hétérologues approprié, caractérisé en ce que la souche de *E. coli* est une souche *E. coli* W.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la souche W est la souche W déposée à l'ATCC sous le numéro 9637.
3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la souche W est un dérivé de la souche déposée à l'ATCC sous le numéro 9637 obtenu par sélection clonale ou manipulation génétique.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le milieu de culture approprié est un milieu de culture approprié pour l'obtention d'une forte densité de biomasse et une forte teneur en protéines hétérologues produites.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le milieu de culture comprend du L-tryptophane.
6. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que la quantité de L-tryptophane dans le milieu de culture est comprise entre 0,05 et 0,5 g/l, de préférence entre 0,1 et 0,3 g/l
7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le milieu de culture comprend du saccharose comme principale source de carbone.
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le milieu de culture ne comprend substantiellement que du saccharose comme source de carbone.
9. Procédé selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que la quantité de saccharose dans le milieu de culture est comprise entre 0,1 et 300 g/l en début de culture, de préférence entre 0,5 et 200 g/l.
10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le milieu de culture approprié comprend en outre une source d'azote organique complémentaire.
11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que la source d'azote organique complémentaire est constituée par des extraits protéiques.

12. Procédé selon l'une des revendications 9 ou 10, caractérisé en ce que l'extrait protéique a la composition suivante : (en g acides aminés pour 100g de produit) Alanine entre 10 et 4, Aspartique entre 11 et 4, Glycine entre 22 et 2,5 et Lysine entre 7 et 4

5 13. Procédé selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisé en ce que la source d'azote organique complémentaire est constituée par les peptones ou protéines de viande ou de pomme de terre, plus particulièrement les dérivés de protéines de pomme de terre.

10 14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que le système d'expression de protéines hétérologues approprié comprend un promoteur  $P_{trp}$ .

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que le promoteur  $P_{trp}$  comprend la séquence d'acides nucléiques représentée par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1).

16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que la 15 protéine hétérologue est une enzyme.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisée en ce que l'enzyme est utile pour la biocatalyse de réactions chimiques.

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que l'enzyme est une nitrilase.

20 19. Souche *E. coli* W, caractérisée en ce qu'elle comprend un système d'expression de protéines hétérologues dont le promoteur est le promoteur  $P_{trp}$ .

25 20. Souche selon la revendication 19, caractérisée en ce que le promoteur  $P_{trp}$  comprend la séquence d'acides nucléiques représentée par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1).

1/4

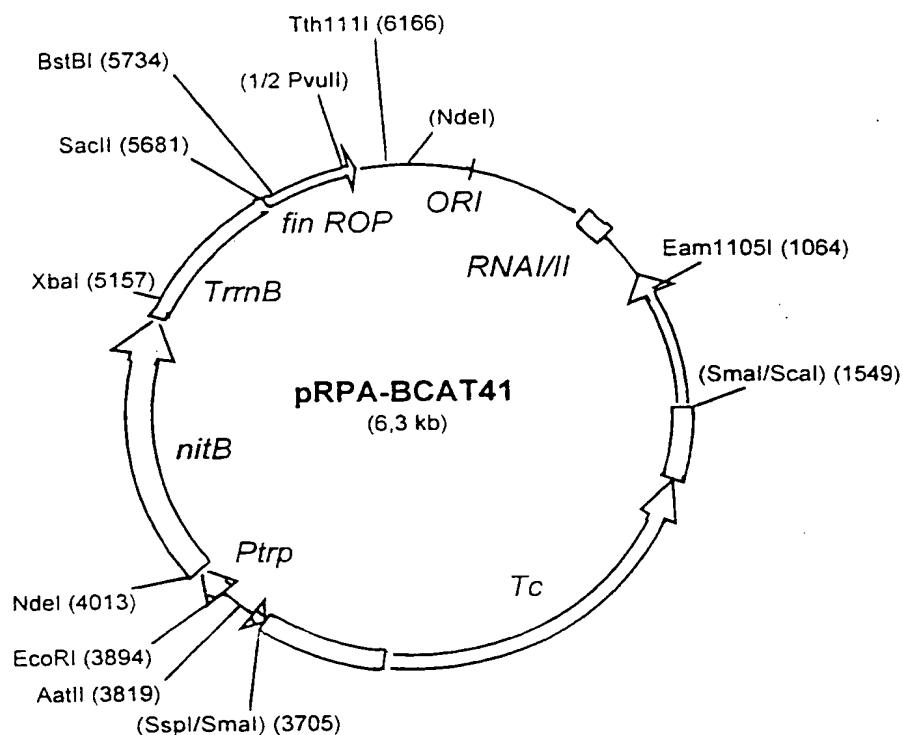


Fig. 1

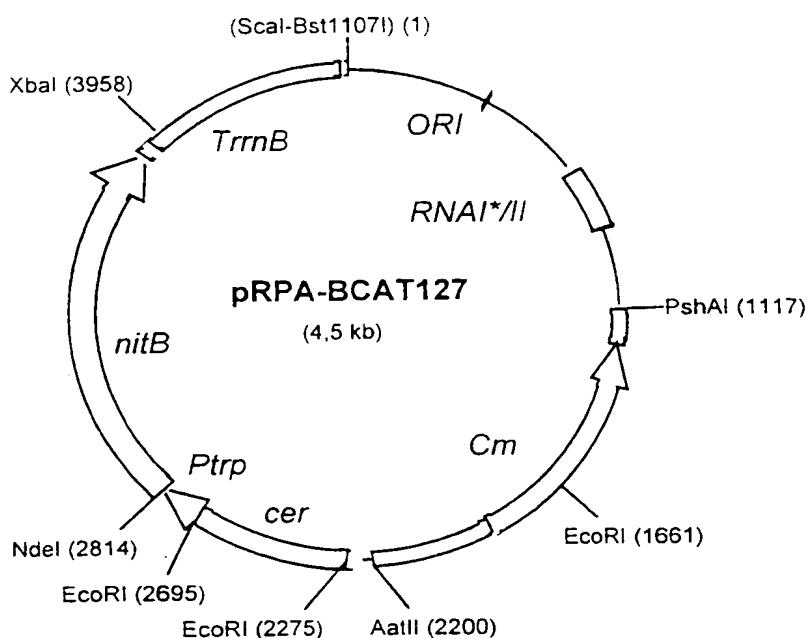


Fig. 2

2/4

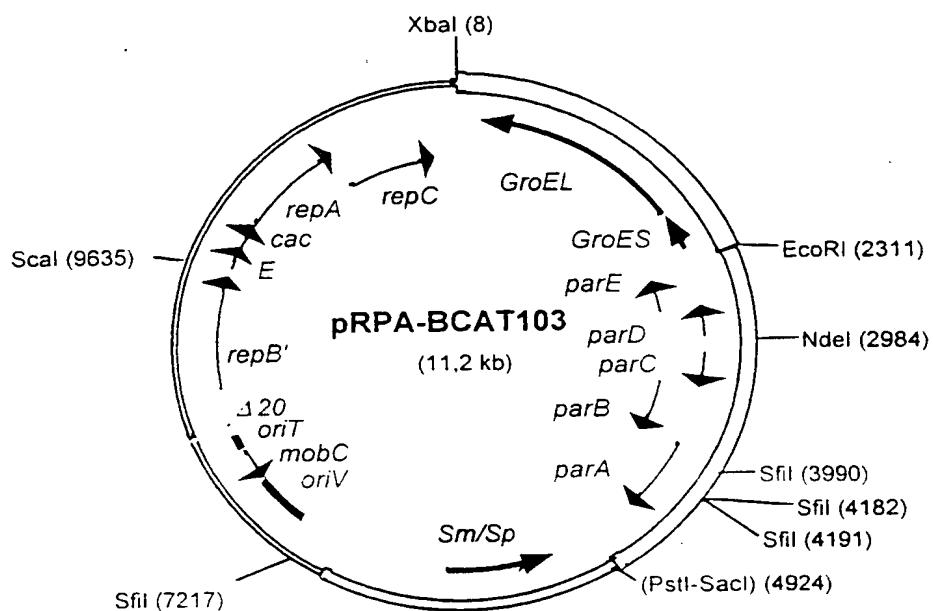


Fig. 3

3/4

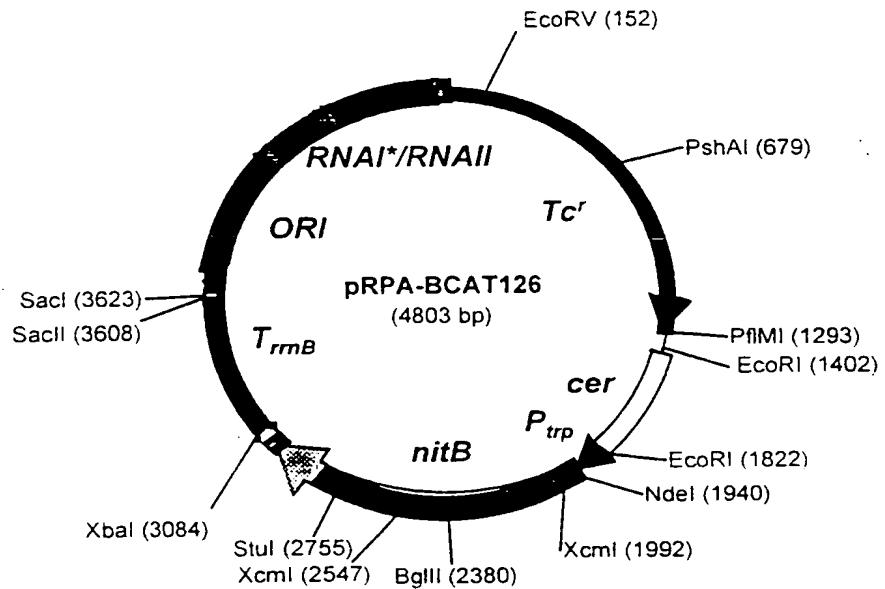


Fig 4

4/4

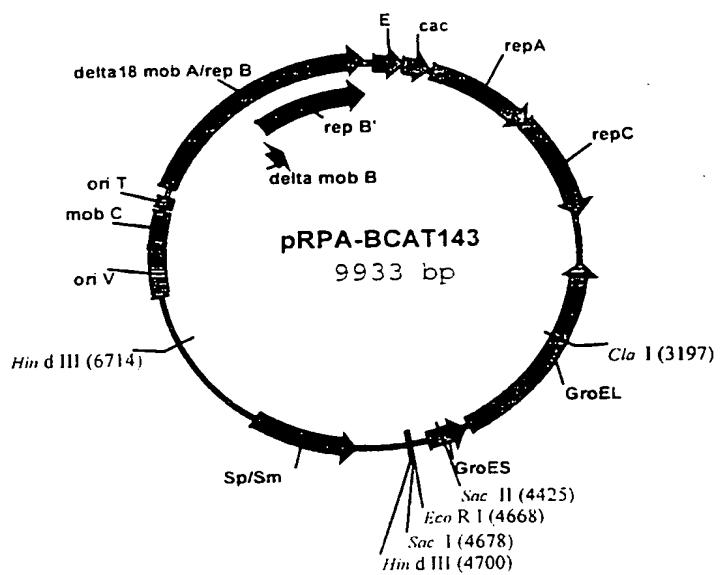


Fig 5

## LISTE DE SEQUENCES

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 4

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 121 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GAATTCCCTG TTGACAATT	ATCATCGAAC TAGTTAACTA GTACGCAGCT TGGCTGCAGG	60
TCGACCTGCA GCCAAGCTTG GGCATACATT CAATCAATTG TTATCTAAGG AAATACTTAC		120
A		121

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1793 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 123..1190

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GAATTCCCTG TTGACAATT	ATCATCGAAC TAGTTAACTA GTACGCAGCT TGGCTGCAGG	60
TCGACCTGCA GCCAAGCTTG GGCATACATT CAATCAATTG TTATCTAAGG AAATACTTAC		120
AT ATG CAG ACA AGA AAA ATC GTC CGG GCA GCC GCC GTA CAG GCC	GCC	167
Met Gln Thr Arg Lys Ile Val Arg Ala Ala Ala Val Gln Ala Ala		
1 5 10 15		
TCT CCC AAC TAC GAT CTG GCA ACG GGT GTT GAT AAA ACC ATT GAG CTG		215
Ser Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr Gly Val Asp Lys Thr Ile Glu Leu		
20 25 30		
GCT CGT CAG GCC CGC GAT GAG GGC TGT GAC CTG ATC GTG TTT GGT GAA		263
Ala Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly Cys Asp Leu Ile Val Phe Gly Glu		
35 40 45		
ACC TGG CTG CCC GGC TAT CCC TTC CAC GTC TGG CTG GGC GCA CCG GCC		311
Thr Trp Leu Pro Gly Tyr Pro Phe His Val Trp Leu Gly Ala Pro Ala		
50 55 60		

TGG TCG CTG AAA TAC AGT GCC CGC TAC TAT GCC AAC TCG CTC TCG CTG Trp Ser Leu Lys Tyr Ser Ala Arg Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Ser Leu 65 70 75	359
GAC AGT GCA GAG TTT CAA CGC ATT GCC CAG GCC GCA CGG ACC TTG GGT Asp Ser Ala Glu Phe Gln Arg Ile Ala Gln Ala Ala Arg Thr Leu Gly 80 85 90 95	407
ATT TTC ATC GCA CTG GGT TAT AGC GAG CGC AGC GGC GGC AGC CTT TAC Ile Phe Ile Ala Leu Gly Tyr Ser Glu Arg Ser Gly Gly Ser Leu Tyr 100 105 110	455
CTG GGC CAA TGC CTG ATC GAC GAC AAG GGC CAG ATG CTG TGG TCG CGT Leu Gly Gln Cys Leu Ile Asp Asp Lys Gly Gln Met Leu Trp Ser Arg 115 120 125	503
CGC AAA CTC AAA CCT ACA CAT GTT GAG CGC ACC GTG TTT GGT GAA GGT Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Val Phe Gly Glu Gly 130 135 140	551
TAT GCC CGA GAT CTG ATT GTG TCC GAC ACC GAG CTG GGC CGC GTC GGT Tyr Ala Arg Asp Leu Ile Val Ser Asp Thr Glu Leu Gly Arg Val Gly 145 150 155	599
GCC CTG TGC TGC TGG GAG CAC CTG TCC CCC TTG AGC AAG TAC GCG CTG Ala Leu Cys Cys Trp Glu His Leu Ser Pro Leu Ser Lys Tyr Ala Leu 160 165 170 175	647
TAC TCC CAG CAC GAA GCC ATT CAC ATT GCC GCC TGG CCG TCC TTT TCG Tyr Ser Gln His Ala Ile His Ile Ala Ala Trp Pro Ser Phe Ser 180 185 190	695
CTG TAC AGC GAA CAG GCC CAT GCG CTC AGC GCC AAG GTG AAC ATG GCT Leu Tyr Ser Glu Gln Ala His Ala Leu Ser Ala Lys Val Asn Met Ala 195 200 205	743
GCC TCG CAA ATC TAT TCG GTT GAA GGC CAG TGC TTT ACC ATC GCC GCC Ala Ser Gln Ile Tyr Ser Val Glu Gly Gln Cys Phe Thr Ile Ala Ala 210 215 220	791
AGC AGT GTC GTC ACC CAG GAG ACA CTG GAC ATG CTG GAA GTA GGT GAA Ser Ser Val Val Thr Gln Glu Thr Leu Asp Met Leu Glu Val Gly Glu 225 230 235	839
CAC AAC GCC TCC CTG CTG AAA GTG GGC GGC AGT TCC ATG ATT TTT His Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Gly Gly Ser Ser Met Ile Phe 240 245 250 255	887
GCG CCG GAC GGA CGC ACA TTG GCT CCC TAC CTG CCA CAC GAT GCC GAA Ala Pro Asp Gly Arg Thr Leu Ala Pro Tyr Leu Pro His Asp Ala Glu 260 265 270	935
GGC CTG ATC ATT GCC GAT CTG AAC ATG GAA GAA ATT GCC TTC GCC AAG Gly Leu Ile Ile Ala Asp Leu Asn Met Glu Glu Ile Ala Phe Ala Lys 275 280 285	983
GCG ATC AAC GAC CCT GTG GGC CAC TAC TCC AAA CCC GAG GCC ACC CGT Ala Ile Asn Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Lys Pro Glu Ala Thr Arg 290 295 300	1031

CTG GTA CTG GAC CTG GGG CAC CGT GAG CCC ATG ACT CGG GTG CAT TCC	1079
Leu Val Leu Asp Leu Gly His Arg Glu Pro Met Thr Arg Val His Ser	
305	310
315	
AAA AGC GTG ATC CAG GAA GAA GCT CCC GAG CCG CAC GTG CAA AGT ACG	1127
Lys Ser Val Ile Gln Glu Glu Ala Pro Glu Pro His Val Gln Ser Thr	
320	325
330	335
GCT GCG CCC GTC GCC GTC AGC CAG ACT CAG GAC TCG GAT ACG CTA CTG	1175
Ala Ala Pro Val Ala Val Ser Gln Thr Gln Asp Ser Asp Thr Leu Leu	
340	345
350	
GTG CAA GAA CCG TCC TGA CCCCAAAAGA TGACAAGGCC CGGGCAAAC	1223
Val Gln Glu Pro Ser	
355	
GTCCGGGTCT TGATTCCTTC TGCGTCCCGG ATCCACTAGT TCTAGAGTCG ACCTGCAGGC	1283
ATGCAAGCTT GGGTCCCACC TGACCCCCATG CCGAACTCAG AAGTGAAACG CCGTAGCGCC	1343
GATGGTAGTG TGGGTCTCC CCATGCGAGA GTAGGAACT GCCAGGCATC AAATAAAACG	1403
AAAGGCTCAG TCGAAAGACT GGGCCTTTCG TTTTATCTGT TGTTTGTGG TGAACGCTCT	1463
CCTGAGTAGG ACAAAATCCGC CGGGAGCGGA TTTGAACGTT GCGAAGCAAC GGCCCGGAGG	1523
GTGGCGGGCA GGACGCCCGC CATAAACTGC CAGGCATCAA ATTAAGCAGA AGGCCATCCT	1583
GACGGATGGC CTTTTTGCCT TTCTACAAAC TCTTCCTGTC GTCATATCTA CAAGCCATCC	1643
CCCCACAGAT ACGGTAAACT AGCCTCGTT TTGCATCAGG AAAGCAGCTA TGAACCAC	1703
CTTAAAACCC TGGAACACAT TTGGCATTGA TCATAATGCT CAGCACATTG TATGTGCCGA	1763
AGACGAACAA CAATTACTCA ATGCCCGCGG	1793

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 35 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: oligonucléotide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

CCCCCCGACA GCTGTCTTGC TTTCGAATTT CTGCC

35

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 26 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: oligonucléotide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

TTGACGTCAG TAGCTGAACA GGAGGG

26

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No  
PCT/FR 99/01343

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 6	C12N15/55	C12N9/78	C12N9/80	C12N15/71	C12N1/21
				//(C12N1/21,C12R1:19)	

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEE S. Y. ET CHANG H. N.: "High cell density cultivation of Escherichia coli W using sucrose as a carbon source" BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 15, no. 9, September 1993 (1993-09), pages 971-974, XP002094347 cited in the application the whole document	1-4, 7-10,16, 17
Y	---	5,6, 14-20

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 October 1999

Date of mailing of the international search report

05.11.99

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Macchia, G

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No

PCT/FR 99/01343

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 596 812 A (RHONE-POULENC CHIMIE (FR); PETRE D; CERBELAUD E; LEVY-SCHIL S; CROUZET) 11 May 1994 (1994-05-11) cited in the application abstract page 3, line 20-24 page 11, line 24-46 page 12, line 44,45 page 13; table 4 page 25 -page 28; claims ---	5,6, 14-20
X	LEE J. ET AL.: "Fed-batch culture of Escherichia coli W by exponential feeding of sucrose as a carbon source" BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES, vol. 11, no. 1, January 1997 (1997-01), pages 59-62, XP002094348 the whole document ---	1-4,7-10
X	EP 0 496 993 A (ANTIBIOTICOS S.P.A. (IT); CAMBIAGHI S.; TOMASELLI S.; VERGA R.) 5 August 1992 (1992-08-05) page 7, line 8-22 page 8, line 30 -page 9, line 12 page 13, line 38 -page 15, line 32; example 9 page 21; claim 4 ---	1-4,7, 10-13, 16,17
X	WO 90 02193 A (UNIVERSITY OF FLORIDA (US); INGRAM L.O.; CONWAY T.; ALTERTHUM F.) 8 March 1990 (1990-03-08) page 6, line 29-36 page 18, line 7-21; example 8 page 19, line 42 -page 23 page 26 -page 28; claims ---	1-4, 7-13,16, 17
X	US 5 354 667 A (ANTIBIOTICOS S.P.A. (IT); CROUX C; PEREZ JC; FUENTES JLB; MALDONADO FS) 11 October 1994 (1994-10-11) column 6, line 4-11 column 7; table 1 column 8, line 49-59 ---	1-4,7, 10-14, 16,17,19
X	EP 0 670 370 A (AJINOMOTO CO. INC. (JP); ONO E.; TSUJIMOTO N.; MATSUI K.; KURAHASHI O.) 6 September 1995 (1995-09-06) page 3, line 58 -page 5, line 9 ---	1-4,7, 10-14, 16,17,19
A	WO 98 18941 A (RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE (FR); FAVRE-BULLE O; PIERRARD J ET AL.) 7 May 1998 (1998-05-07) abstract page 6, paragraph 2 page 21, line 10 -page 26, line 15; examples 4,5 ---	5,6,14, 18

-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01343

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 90 02800 A (FARMITALIA CARLO ERBA SRL (IT); BERGONZONI; ISACCHI; SARMIENTOS; CAUET) 22 March 1990 (1990-03-22) figure 7 ---	15,20
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 71, no. 21, 24 November 1969 (1969-11-24) Columbus, Ohio, US; abstract no. 100408, DEVCIC, BRANKA ET AL: "Effect of some factors on the growth and penicillin acylase activity of Escherichia coli ATCC 9637" XP002117599 abstract & MIKROBIOLOGIJA (1968), 5(2), 189-96, 1968, ---	11-13
A	FR 2 128 587 A (ASAHI KASEI KOGYO K.K. (JP)) 20 October 1972 (1972-10-20) page 7, line 38 -page 8, line 35; example 2 ---	11-13
A	US 5 000 000 A (UNIVERSITY OF FLORIDA (US); INGRAM L.O; CONWAY T.; ALTERTHUM F.) 19 March 1991 (1991-03-19) column 16; example 8 ---	11-13
A	US 4 246 346 A (AKTIEBOLAGET FERMENTA (SE); LARSSON P.-O.; MOSBACH K.H.; OHLSON S.A.) 20 January 1981 (1981-01-20) column 2, line 59 -column 3, line 20 -----	11-13

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/01343

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0596812	A 11-05-1994	FR 2694571 A		11-02-1994
		BR 9305280 A		28-06-1994
		CA 2103616 A		11-02-1994
		DE 69314280 D		06-11-1997
		DE 69314280 T		05-02-1998
		ES 2108850 T		01-01-1998
		JP 7051070 A		28-02-1995
		MX 9304825 A		31-05-1994
		SG 48047 A		17-04-1998
		US 5629190 A		13-05-1997
		US 5635391 A		03-06-1997
<hr/>				
EP 0496993	A 05-08-1992	IT 1252308 B		08-06-1995
		AT 137535 T		15-05-1996
		CA 2058216 A		22-06-1992
		DE 69119216 D		05-06-1996
		DE 69119216 T		05-09-1996
		ES 2086470 T		01-07-1996
		IE 75201 B		27-08-1997
		JP 2851021 B		27-01-1999
		JP 5211890 A		24-08-1993
		US 5424196 A		13-06-1995
<hr/>				
WO 9002193	A 08-03-1990	US 5000000 A		19-03-1991
		CA 1335430 A		02-05-1995
		EP 0431047 A		12-06-1991
		JP 5502366 T		28-04-1993
		US 5554520 A		10-09-1996
		US 5482846 A		09-01-1996
		US 5028539 A		02-07-1991
		US 5821093 A		13-10-1998
		US 5916787 A		29-06-1999
		US 5424202 A		13-06-1995
		US 5487989 A		30-01-1996
<hr/>				
US 5354667	A 11-10-1994	ES 2020792 A		16-09-1991
		AT 151461 T		15-04-1997
		DE 69125541 D		15-05-1997
		DE 69125541 T		13-11-1997
		DK 469919 T		21-07-1997
		EP 0469919 A		05-02-1992
		GR 3023866 T		30-09-1997
		JP 6090746 A		05-04-1994
<hr/>				
EP 0670370	A 06-09-1995	JP 7203980 A		08-08-1995
		BR 9500052 A		03-10-1995
		CN 1128295 A		07-08-1996
		US 5573945 A		12-11-1996
<hr/>				
WO 9818941	A 07-05-1998	FR 2755143 A		30-04-1998
		AU 4951397 A		22-05-1998
		CZ 9901454 A		11-08-1999
		EP 0934419 A		11-08-1999
<hr/>				
WO 9002800	A 22-03-1990	AT 98693 T		15-01-1994
		AU 620925 B		27-02-1992
		AU 4317189 A		02-04-1990
		CN 1041181 A		11-04-1990

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/FR 99/01343

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows

see supplementary sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**  

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## 1. Claims: 1-18

Industrial method for preparing heterologous proteins in E.coli, W strain.

## 2. Claims: 19, 20

E.coli W strain, characterised in that it comprises a system for expressing heterologous proteins whereof the promoter is the Ptrp promoter.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/01343

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9002800	A	DE 68911461 D DE 68911461 T DK 120290 A EP 0363675 A EP 0396664 A ES 2061855 T JP 2888575 B JP 3501855 T NZ 230621 A PT 91719 A,B US 5352589 A YU 179489 A	27-01-1994 19-05-1994 16-07-1990 18-04-1990 14-11-1990 16-12-1994 10-05-1999 25-04-1991 25-06-1992 30-03-1990 04-10-1994 31-10-1991
FR 2128587	A	20-10-1972	JP 49011435 B JP 48039693 A JP 51005479 B DE 2209591 A
US 5000000	A	19-03-1991	CA 1335430 A EP 0431047 A JP 5502366 T WO 9002193 A US 5482846 A US 5821093 A US 5916787 A US 5424202 A US 5487989 A US 5554520 A US 5028539 A
US 4246346	A	20-01-1981	NONE

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 99/01343

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/55 C12N9/78 C12N9/80 C12N15/71 C12N1/21  
C12P21/02 // (C12N1/21, C12R1:19)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C12N C12P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	LEE S. Y. ET CHANG H. N.: "High cell density cultivation of Escherichia coli W using sucrose as a carbon source" BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 15, no. 9, septembre 1993 (1993-09), pages 971-974, XP002094347 cité dans la demande le document en entier	1-4, 7-10, 16, 17
Y	---	5, 6, 14-20

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### ° Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
5 octobre 1999	05.11.99
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P. B. 5818 Patenttaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Macchia, G

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 99/01343

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP 0 596 812 A (RHONE-POULENC CHIMIE (FR); PETRE D; CERBELAUD E; LEVY-SCHIL S; CROUZET) 11 mai 1994 (1994-05-11) cité dans la demande abrégé page 3, ligne 20-24 page 11, ligne 24-46 page 12, ligne 44,45 page 13; tableau 4 page 25 -page 28; revendications ---	5,6, 14-20
X	LEE J. ET AL.: "Fed-batch culture of Escherichia coli W by exponential feeding of sucrose as a carbon source" BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES, vol. 11, no. 1, janvier 1997 (1997-01), pages 59-62, XP002094348 le document en entier	1-4,7-10
X	EP 0 496 993 A (ANTIBIOTICOS S.P.A. (IT); CAMBIAGHI S.; TOMASELLI S.; VERGA R.) 5 août 1992 (1992-08-05) page 7, ligne 8-22 page 8, ligne 30 -page 9, ligne 12 page 13, ligne 38 -page 15, ligne 32; exemple 9 page 21; revendication 4 ---	1-4,7, 10-13, 16,17
X	WO 90 02193 A (UNIVERSITY OF FLORIDA (US); INGRAM L.O.; CONWAY T.; ALTERTHUM F.) 8 mars 1990 (1990-03-08) page 6, ligne 29-36 page 18, ligne 7-21; exemple 8 page 19, ligne 42 -page 23 page 26 -page 28; revendications ---	1-4, 7-13,16, 17
X	US 5 354 667 A (ANTIBIOTICOS S.P.A. (IT); CROUX C; PEREZ JC; FUENTES JLB; MALDONADO FS) 11 octobre 1994 (1994-10-11) colonne 6, ligne 4-11 colonne 7; tableau 1 colonne 8, ligne 49-59 ---	1-4,7, 10-14, 16,17,19
X	EP 0 670 370 A (AJINOMOTO CO. INC. (JP); ONO E.; TSUJIMOTO N.; MATSUI K.; KURAHASHI O.) 6 septembre 1995 (1995-09-06) page 3, ligne 58 -page 5, ligne 9 ---	1-4,7, 10-14, 16,17,19
A	WO 98 18941 A (RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE (FR); FAVRE-BULLE O; PIERRARD J ET AL.) 7 mai 1998 (1998-05-07) abrégé page 6, alinéa 2 page 21, ligne 10 -page 26, ligne 15; exemples 4,5 ---	5,6,14, 18

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Re Internationale No  
PC./FR 99/01343

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 90 02800 A (FARITALIA CARLO ERBA SRL (IT); BERGONZONI; ISACCHI; SARMIENTOS; CAUET) 22 mars 1990 (1990-03-22) figure 7 ---	15,20
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 71, no. 21, 24 novembre 1969 (1969-11-24) Columbus, Ohio, US; abstract no. 100408, DEVCIC, BRANKA ET AL: "Effect of some factors on the growth and penicillin acylase activity of Escherichia coli ATCC 9637" XP002117599 abrégé & MIKROBIOLOGIJA (1968), 5(2), 189-96, 1968, ---	11-13
A	FR 2 128 587 A (ASAHI KASEI KOGYO K.K. (JP)) 20 octobre 1972 (1972-10-20) page 7, ligne 38 -page 8, ligne 35; exemple 2 ---	11-13
A	US 5 000 000 A (UNIVERSITY OF FLORIDA (US); INGRAM L.O; CONWAY T.; ALTERTHUM F.) 19 mars 1991 (1991-03-19) colonne 16; exemple 8 ---	11-13
A	US 4 246 346 A (AKTIEBOLAGET FERMENTA (SE); LARSSON P.-O.; MOSBACH K.H.; OHLSON S.A.) 20 janvier 1981 (1981-01-20) colonne 2, ligne 59 -colonne 3, ligne 20 -----	11-13

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs à la famille de brevets

Demande Internationale N°

PC1/FR 99/01343

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)			Date de publication
EP 0590012 A	11-05-1994	FR 2694571 A	BR 9305280 A	CA 2103616 A	11-02-1994
		DE 69314280 D	DE 69314280 T	ES 2108850 T	06-11-1997
		JP 7051070 A	MX 9304825 A	SG 48047 A	05-02-1998
		US 5629190 A	US 5635391 A	US 5635391 A	01-01-1998
					13-05-1997
					03-06-1997
EP 0496993 A	05-08-1992	IT 1252308 B	AT 137535 T	CA 2058216 A	08-06-1995
		DE 69119216 D	DE 69119216 T	ES 2086470 T	15-05-1996
		IE 75201 B	JP 2851021 B	JP 5211890 A	22-06-1992
		US 5424196 A	US 5424196 A	US 5424196 A	05-09-1996
					01-07-1996
					27-08-1997
					27-01-1999
					24-08-1993
					13-06-1995
WO 9002193 A	08-03-1990	US 5000000 A	CA 1335430 A	EP 0431047 A	19-03-1991
		JP 5502366 T	US 5554520 A	US 5482846 A	02-05-1995
		US 5028539 A	US 5821093 A	US 5916787 A	12-06-1991
		US 5424202 A	US 5487989 A	US 5424202 A	10-09-1996
					09-01-1996
					02-07-1991
					13-10-1998
					29-06-1999
					13-06-1995
					30-01-1996
US 5354667 A	11-10-1994	ES 2020792 A	AT 151461 T	DE 69125541 D	16-09-1991
		DE 69125541 T	DK 469919 T	EP 0469919 A	15-04-1997
		JP 3023866 T	GR 6090746 A	JP 6090746 A	15-05-1997
					13-11-1997
					21-07-1997
					05-02-1992
					30-09-1997
					05-04-1994
EP 0670370 A	06-09-1995	JP 7203980 A	BR 9500052 A	CN 1128295 A	08-08-1995
		US 5573945 A	US 5573945 A	US 5573945 A	03-10-1995
					07-08-1996
					12-11-1996
WO 9818941 A	07-05-1998	FR 2755143 A	AU 4951397 A	CZ 9901454 A	30-04-1998
		EP 0934419 A	EP 0934419 A	EP 0934419 A	22-05-1998
					11-08-1999
					11-08-1999
WO 9002800 A	22-03-1990	AT 98693 T	AU 620925 B	AU 4317189 A	15-01-1994
		CN 1041181 A	CN 1041181 A	CN 1041181 A	27-02-1992
					02-04-1990
					11-04-1990

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR 99/01343

### Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1.  Les revendications n°<sup>es</sup> se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
  
2.  Les revendications n°<sup>es</sup> se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
  
3.  Les revendications n°<sup>es</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième onrases de la règle 6.4 a).

### Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

Voir feuille supplémentaire

1.  Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
  
2.  Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
  
3.  Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°<sup>es</sup>
  
4.  Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°<sup>es</sup>

Remarque quant à la réserve

Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant

Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

1. revendications: 1-18

Procédé industriel de préparation de protéines hétérologues dans E.coli, souche W.

2. revendications: 19, 20

Souche E.coli W, caractérisée en ce qu'elle comprend un système d'expression de protéines hétérologues dont le promoteur est le promoteur Ptrp.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document International No

PCT/FR 99/01343

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 90002800 A		DE 68911461 D DE 68911461 T DK 120290 A EP 0363675 A EP 0396664 A ES 2061855 T JP 2888575 B JP 3501855 T NZ 230621 A PT 91719 A,B US 5352589 A YU 179489 A	27-01-1994 19-05-1994 16-07-1990 18-04-1990 14-11-1990 16-12-1994 10-05-1999 25-04-1991 25-06-1992 30-03-1990 04-10-1994 31-10-1991
FR 2128587 A	20-10-1972	JP 49011435 B JP 48039693 A JP 51005479 B DE 2209591 A	16-03-1974 11-06-1973 20-02-1976 14-09-1972
US 5000000 A	19-03-1991	CA 1335430 A EP 0431047 A JP 5502366 T WO 9002193 A US 5482846 A US 5821093 A US 5916787 A US 5424202 A US 5487989 A US 5554520 A US 5028539 A	02-05-1995 12-06-1991 28-04-1993 08-03-1990 09-01-1996 13-10-1998 29-06-1999 13-06-1995 30-01-1996 10-09-1996 02-07-1991
US 4246346 A	20-01-1981	AUCUN	